

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-027113

(43)Date of publication of application : 04.02.1994

(51)Int.Cl.

G01N 33/68

(21)Application number : 04-181183

(71)Applicant : SEIKO INSTR INC  
KURABO IND LTD

(22)Date of filing : 08.07.1992

(72)Inventor : TSUGITA AKIRA  
KAMO MASAHARU  
IWADATE KANDAI  
UCHIDA TOYOAKI  
SANO MITSURU**(54) METHOD FOR DETERMINING AMINO ACID SEQUENCE FROM CARBOXY TERMINAL OF PROTEIN OR PEPTIDE****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To determine amino acid sequence from a C end of protein without using enzyme by making free amino acid into acetyl and extracting and identifying oxazolone derivative from amino acid of acetylated carboxy (C) end by function of acetic anhydride vapor.

**CONSTITUTION:** Amino acid at a C end is made free from acetylated protein with its C end oxazolone derivative by function of organic acid vapor expressed by a general formula of  $CF_3-(CF_2)_n-COOH$  (where n is 1 or 2). Acetic anhydride vapor is made to function to mixture of this amino acid and protein lacking in amino acid at the C end to provide mixture of acetylated amino acid and protein lacking in amino acid at the C end. This is made into mixture of oxazolone derivative due to acetylated C end amino acid and protein of newly produced C end oxazolone derivative by function of acetic anhydride vapor. The oxazolone derivative due to the C end amino acid is extracted and identified from this mixture by organic solvent and this scan is repeated.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination] 15.06.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number] 3175859

[Date of registration] 06.04.2001

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平 6 - 2 7 1 1 3

(43) 公開日 平成 6 年 (1994) 2 月 4 日

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>  
G01N 33/68

識別記号

庁内整理番号  
7055-2J

F I

技術表示箇所

審査請求 未請求 請求項の数 12 (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願平 4 - 1 8 1 1 8 3  
(22) 出願日 平成 4 年 (1992) 7 月 8 日

(71) 出願人 0 0 0 0 0 2 3 2 5  
セイコー電子工業株式会社  
東京都江東区亀戸 6 丁目 3 1 番 1 号  
(71) 出願人 0 0 0 0 0 1 0 9 6  
倉敷紡績株式会社  
岡山県倉敷市本町 7 番 1 号  
(72) 発明者 次田 皓  
千葉県柏市泉町 1 7 - 2 8 石塚ビル 3 0  
5  
(72) 発明者 加茂 政晴  
千葉県野田市山崎 2 7 0 4 - 4 8 千葉ハ  
イツ 2 0 1  
(74) 代理人 弁理士 林 敬之助

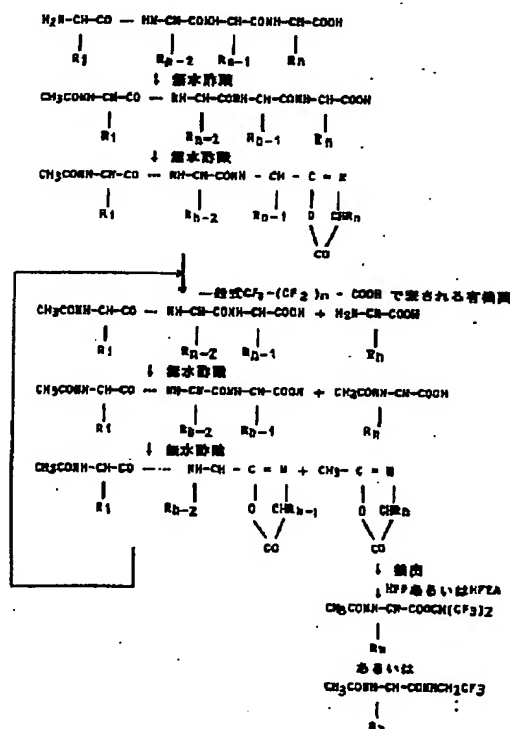
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法

#### (57) 【要約】

【目的】 酵素を用いることなく、タンパク質あるいはペプチド (タンパク質等) のカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する。

【構成】 カルボキシ末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質等に、所定の直鎖有機酸の蒸気を用いて、カルボキシ末端のアミノ酸を遊離させ、そのアミノ酸とカルボキシ末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質等との混合物に無水酢酸の蒸気を用いて、そのアミノ酸をアセチル化し、アセチル化されたアミノ酸とカルボキシ末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質等との混合物とし、さらに無水酢酸の蒸気を用いて、アセチル化されたカルボキシ末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体と、新たに生成されたカルボキシ末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質等との混合物とし、この混合物からアセチル化されたカルボキシ末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体を有機溶媒で抽出して同定する、という操作を繰り返すことによりアミノ酸配列を決定する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第 1 段階として、カルボキシ末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドに、一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  ( $n$  は 1 あるいは 2) で表される有機酸の蒸気を作用させて、カルボキシ末端のアミノ酸を遊離させた後、第 2 段階として、そのアミノ酸とカルボキシ末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物に無水酢酸の蒸気を作用させて、そのアミノ酸をアセチル化し、アセチル化されたアミノ酸とカルボキシ末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とし、第 3 段階として、この混合物にさらに無水酢酸の蒸気を作用させて、アセチル化されたカルボキシ末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体と、新たに生成されたカルボキシ末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とし、この混合物からアセチル化されたカルボキシ末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体を有機溶媒で抽出して同定する、という一連の操作を繰り返すことを特徴とした、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 2】 上記、カルボキシ末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドは、タンパク質あるいはペプチドに無水酢酸の蒸気を作用させてアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとした後に、さらに無水酢酸の蒸気を作用させて得ることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 3】 上記、一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  ( $n$  は 1 あるいは 2) で表される有機酸の蒸気を作用させる際の有機酸溶液の濃度は 70 % 以上であることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 4】 上記、一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  ( $n$  は 1 あるいは 2) で表される有機酸の蒸気を作用させる温度は 60 から 90 °C であることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 5】 上記、一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  ( $n$  は 1 あるいは 2) で表される有機酸の蒸気を作用させる時間は 5 分間以上であることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 6】 上記、一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  ( $n$  は 1 あるいは 2)

で表される有機酸を作用させた後、アセトニトリルあるいはピリジンを加えて減圧し、用いた溶媒と試薬とを除去することを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 7】 上記、有機酸の蒸気を作用させた反応混合物に無水酢酸の蒸気を作用させることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

10 【請求項 8】 上記、アセチル化されたアミノ酸とカルボキシ末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物に作用させる無水酢酸の蒸気は、ピリジンを含む有機溶媒溶液から作られるものであることを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

20 【請求項 9】 上記、アセチル化されたアミノ酸由来のオキサゾロン誘導体に、フッ素を含むアルコールの蒸気またはアミンの蒸気を作用させて、アセチル化されたアミノ酸のエステルまたはアセチル化されたアミノ酸のアミドとして検出することを特徴とした、請求項 1 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 10】 上記、タンパク質あるいはペプチドに無水酢酸を含む溶液から作られる蒸気を作用させることを特徴とした、請求項 2 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

30 【請求項 11】 上記、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドに作用させる無水酢酸の蒸気は、ピリジンを含む有機溶媒溶液から作られたものであることを特徴とした、請求項 2 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

【請求項 12】 上記、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドに無水酢酸の蒸気を作用させた後、アセトニトリルあるいはピリジンを加えて減圧し、用いた溶媒と試薬とを除去することを特徴とした、請求項 2 記載のタンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端からのアミノ酸配列を決定する方法。

40 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、タンパク質あるいはペプチドの 1 次構造解析法に関する。

【0002】

【従来の技術】 従来、タンパク質あるいはペプチドのカルボキシ末端 (C 末端) からのアミノ酸配列を決定するためには、図 2 に示すようにタンパク質あるいはペプチドにカルボキシペプチダーゼを反応させ、反応液を経時的に 1 部ずつ採取し、その反応液をアミノ酸分析装置で分析して遊離されたアミノ酸を定量する方法が用いられ

てきた。(日本生化学会編、生化学実験講座第1巻、タンパク質の化学II、203-211ページ、1976年発行)

また、その反応液を質量分析装置にかけてC末端側のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドの質量を測定する方法も報告されている。(A. Tsugita, R. van den Broek, M. Pyzybylski, FEBS. Lett. 137, 19(1982))

さらに、図3に示すようにC末端を無水酢酸で活性化し、トリメチルシリルイソチオシアネート(TMS-ITC)を結合させ、塩酸で切断するという一連の操作を繰り返すことを利用した配列分析法も報告されている。

(D. H. Hawke, H. W. Lahm, J. E. Shively, C. W. Todd, Anal. Biochem. 166, 298(1987))

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来のカルボキシペプチダーゼを用いる方法は、酵素の基質特異性や活性がC末端アミノ酸あるいはそれに隣接するアミノ酸によってさまざまであること、そして他の酵素の混在があることから求めている以外のペプチド結合の切断が起き、正確な分析が困難になることがあった。またこの方法は酵素の自己消化性によってアミノ酸が遊離されるため高感度分析には適していない。

【0004】また、TMS-ITCを用いる方法は反応収率が悪い実用化されていない。そこで本発明は、酵素を用いることなく、タンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定する方法を提供しようとするものである。

#### 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明においては、上記の欠点を克服しC末端からのアミノ酸の配列分析を実行するために、第1段階として、カルボキシ末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドに、一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  (nは1あるいは2) で表される有機酸の蒸気を用いて、カルボキシ末端のアミノ酸を遊離させた後、第2段階として、そのアミノ酸とカルボキシ末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物に無水酢酸の蒸気を用いて、そのアミノ酸をアセチル化し、アセチル化されたアミノ酸とカルボキシ末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とし、第3段階として、この混合物にさらに無水酢酸の蒸気を用いて、アセチル化されたカルボキシ末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体と、新たに生成されたカルボキシ末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とし、この混合物からアセチル化されたカルボキシ末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体を有機溶媒で抽出して同定する、という一連の操作を繰り返した。

#### 【0006】

【作用】上記手段により、酵素を用いることなく、タンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することが可能になった。

#### 【0007】

【実施例】以下実施例に基づいて本発明を詳細に説明する。

(実施例1) ここでは実験方法の詳細を述べる。

【0008】図1は本発明の分析方法を示す工程図である。まず、タンパク質あるいはペプチドに無水酢酸の蒸気を用いて、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとする。そしてアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドに、さらに無水酢酸の蒸気を用いてオキサゾロン誘導体を生成させる。

【0009】この、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  (nは1あるいは2) で表される有機酸の蒸気、すなわちペンタフルオロプロピオン酸(PFP A, n=1)の蒸気あるいはヘプタフルオロ酪酸(HFBA, n=2)の蒸気を用いてC末端のアミノ酸を遊離させる。このアミノ酸に無水酢酸を用いてアセチル化する。このアセチル化されたアミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの反応混合物にさらに無水酢酸を用いて、アセチル化されたアミノ酸由来のオキサゾロン誘導体と新たに生成されたC末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とする。

【0010】この混合物から、アセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体を抽出する。この抽出されたアセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体に、アルコールの蒸気、例えば1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-ブチルアルコール(HF Pと略記する)の蒸気、あるいはアミンの蒸気、例えば1, 1, 1-トリフルオロ-2-アミノエタン(HFA Eと略記する)の蒸気を用いて、アセチル化されたアミノ酸のエステルあるいはアセチル化されたアミノ酸のアミドとして同定する。

【0011】以降、前段落に述べた工程を繰り返すことにより、タンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することが出来る。本発明のアミノ酸配列分析の手順は以下のとおりである。まずタンパク質あるいはペプチド試料を含む試料溶液を小型の試験管に入れた後乾燥させる。ここで、試験管に30%の無水酢酸と1%のピリジンを含む酢酸溶液を入れておく。この試験管に先ほどの試料を入れた小型の試験管を入れる。この試験管内を真空ポンプで減圧下に封管し、30℃に10分間保つ(図4参照)。

【0012】ここで、タンパク質あるいはペプチドは無水酢酸の作用によって、アセチル化されたタンパク質あ

るいはペプチドとなる。この反応後、この試験管の上部を開管し、小型の試験管内を取り出す。ここにアセトニトリルあるいはピリジンを加えて減圧乾固し、用いた試薬と溶媒とを除去する。

【0013】こうして得られた試料に、無水のアセトニトリルを溶媒とした0.1%のピリジンを含む30%の無水酢酸を用いて、30℃において10分間無水酢酸の蒸気を作用させた後、溶媒と無水酢酸を除去する。ここで、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドはオキサゾロン誘導体となる。このための手順は、この段落で述べた反応条件を除いて前段落に述べた工程と同じである。

【0014】このアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体にベンタフルオロプロピオン酸(PFPA)の蒸気あるいはヘプタフルオロ酪酸(HFBA)の蒸気を90℃で10分間加熱して作用させる。ここで、C末端のアミノ酸が遊離され、そのアミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物となる。この手順も前段落に述べた工程と同じである。この後、封管をあけて内側の試験管を取り出して乾燥させる。

【0015】次に、この混合物に無水酢酸の蒸気を作用させる。この手順は初めに試料をアセチル化したものと同一である。ここで、C末端アミノ酸が無水酢酸の作用によってアセチル化され、アセチル化されたC末端アミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物を得ることができる。

【0016】さらに、この混合物に無水酢酸の蒸気を作用させる。このための手順はオキサゾロン誘導体を得るための既に述べたものと同一である。ここで、アセチル化されたC末端アミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドは、それぞれアセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体と新たに生成されたC末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとなる。

【0017】次いで、これらの混合物から、ブチルクロライド、クロロホルム、あるいはジイソプロピルエーテルを用いて、アセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体を抽出する。このアセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体に、1、1、1、3、3、3-ヘキサフルオロ-2-プロピルアルコールの蒸気を50℃において10分間作用させて、アセチル化されたアミノ酸のエステルとして検出する。作用させる手順は、用いた試薬と反応条件を除いて、前述のアセチル化あるいはオキサゾロン化のそれと同じである。

【0018】この最後の手順においては、C末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体に、1、1、1-トリフル

オロ-2-アミノエタンの蒸気を50℃において10分間作用させて、アセチル化されたアミノ酸のアミドとして検出することもできる。以下、C末端のアミノ酸を失い、新たに生成されたC末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドに、PFPAの蒸気あるいはHFBAの蒸気を作用させる操作以降の手順を繰り返すことによって、タンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

10 【0019】(実施例2)以降、配列番号1のジペプチド、Val-Phe、を試料とした実験結果を用いて前述の工程を説明する。ここでは、ファーストアトムボンバードメント質量分析(FAB-MS)法を用いて、生成物の質量を測定した。測定に用いた装置及びその測定条件は以下の通りである。

【0020】装置本体：日本電子製 HX110型

イオン化法：FAB(ポジティブ)

イオン化ガス：キセノン

加速電圧：10kV

20 マトリックス：グリセロール

図5は、Val-Phe そのものの質量スペクトルを示したものである。図6は、このジペプチドに、30%の無水酢酸と1%のピリジンを含む酢酸溶液を用いて、無水酢酸の蒸気を30℃において10分間作用させて得られた反応生成物の質量スペクトルである。

【0021】図5において示したジペプチド由来の分子イオンが消失し、新たにアセチル化されたジペプチドの分子イオンが検出された。質量スペクトル中ではアセチル化された化学種をAc-Xと表現する。例えば、Ac-Val-Pheはアセチル化されたVal-Phe のことである。このことから、ここで述べた反応条件においてアセチル化が定量的に進行したことがわかる。この条件は、アミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったタンパク質あるいはペプチドとの混合物に無水酢酸を作用させてアセチル化する条件と同一である。

【0022】図7は、このアセチル化されたジペプチドに、無水のアセトニトリルを溶媒とした0.1%のピリジンを含む30%の無水酢酸を用いて、30℃において10分間無水酢酸の蒸気を作用させて得られた反応生成物の質量スペクトルである。図6において示したアセチル化されたジペプチド由来の分子イオンが消失し、新たにアセチル化されたジペプチドのオキサゾロン誘導体の分子イオンが検出された。このことから、ここで述べた反応条件においてオキサゾロン化が定量的に進行したことがわかる。この条件は、アセチル化されたC末端アミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物に無水酢酸の蒸気を作用させてオキサゾロン誘導体を得る条件と同一である。

50 【0023】図8は、このアセチル化されたジペプチド

のオキサゾロン誘導体に、90℃で10分間加熱して、100%のPFPAの蒸気を作用させて得られた反応生成物の質量スペクトルである。図7において示したアセチル化されたジペプチドのオキサゾロン誘導体由来の分子イオンが消失し、新たにアセチル化されたバリンと、フェニルアラニンの分子イオンが検出された。このことから、ここで述べた反応条件においてカルボキシ末端のアミノ酸が遊離される反応が定量的に進行したことがわかる。また、100%のHFB Aの蒸気を作用させて得られた反応生成物を分析したところは、図8とほぼ同一の質量スペクトルが得られた。

【0024】ここで述べたことは、図1に示した工程を実行することによって逐次的にC末端のアミノ酸を得ることが可能なことを示している。

(実施例3)ここでは、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気を作用させる際の有機酸の濃度と反応効率との関係を示す。

【0025】実施例2において述べたように、アセチル化されたジペプチドのオキサゾロン誘導体に、90℃で10分間加熱して、100%のPFPAの蒸気を作用させた場合に定量的に反応が進むことが、図7と図8との比較から確かめられた。この有機酸の濃度を90%(アセトニトリル溶液)とした場合の蒸気を作用させた結果を示したものが図9である。この場合には、アセチル化されたバリンの分子イオンと共に、アセチル化されたジペプチド及びそのオキサゾロン誘導体の分子イオンも検出されている。

【0026】図10はさらに有機酸の濃度を80%とした場合の蒸気を作用させた結果を示したものである。この場合にも、アセチル化されたバリンの分子イオンと共に、アセチル化されたジペプチド及びそのオキサゾロン誘導体の分子イオンが検出されている。そしてこの場合、アセチル化されたバリンの分子イオンの相対的な強度は、アセチル化されたジペプチド及びそのオキサゾロン誘導体の分子イオンの強度と比較して、図9に示した有機酸の濃度を90%とした場合よりも小さくなっていることがわかる。

【0027】図11はさらに有機酸の濃度を80%とした場合の結果を示したものである。この場合にも、アセチル化されたバリンの分子イオンと共に、アセチル化されたジペプチド及びそのオキサゾロン誘導体の分子イオンが検出されている。そしてこの場合の結果は、80%とした場合とほぼ同一であった。

【0028】これらのことから、有機酸の濃度は70%を越える必要があることがわかる。

(実施例4)ここでは、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気を作用させる際の温度と反応効率との関係を示す。

【0029】図12、13、14、15は、それぞれ作

用させる温度を90℃、80℃、70℃、60℃とした場合の結果を示したものである。図からわかるように、検討した各温度において、アセチル化されたジペプチドのオキサゾロン誘導体が有機酸の蒸気的作用を受けて生成したアセチル化されたバリン由来の分子イオンが検出されている。そして、温度が高くなるにつれてこの反応の反応効率は高くなり、90℃において定量的に進行する事がわかる。但しこの場合、生成物をメタノールで抽出し、アセチル化されたバリンのメチルエステルとして検出した。

【0030】(実施例5)ここでは、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気を作用させる際の反応時間と反応効率との関係を示す。図16、17、18は、それぞれ作用させる時間を、10分間、5分間、2分間とした場合の結果を示したものである。図からわかるように、検討した各時間アセチル化されたジペプチドのオキサゾロン誘導体に有機酸の蒸気を作用させた際、生成したアセチル化されたバリン由来の分子イオンが検出されている。そして、時間が長くなるにつれてこの反応の反応効率は高くなる事がわかる。作用させる時間を2分間とした場合の反応効率は低かった。

【0031】(実施例6)ここでは、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドをオキサゾロン誘導体化する際に、ビリジンの添加によって反応効率が向上することを示す。実施例2において説明したように、図7はアセチル化されたジペプチドに、無水のアセトニトリルを溶媒とした0.1%のビリジンを含む30%の無水酢酸を用いて、30℃において10分間無水酢酸の蒸気を作用させて得られた反応生成物の質量スペクトルを示したものである。この条件からビリジンを除いた場合に得られた結果が図19である。オキサゾロン誘導体の分子イオンと共にアセチル化されたジペプチドの分子イオンも検出されている。

【0032】また、ビリジンの濃度を1%とした場合に得られた結果が図20である。この場合には、図7に示した結果と同様に、アセチル化されたジペプチドの分子イオンは検出されなかった。これらのことから、アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドをオキサゾロン誘導体化する際に、ビリジンの添加により反応効率が向上することがわかる。

【0033】(実施例7)ここでは、遊離されたアミノ酸が無水酢酸の蒸気的作用でアセチル化され、さらに無水酢酸の蒸気的作用でアセチル化されたアミノ酸が、アセチル化されたアミノ酸のオキサゾロン誘導体となる事を示す。反応条件は実施例2で述べたものと同一である。

【0034】図21に、得られたアセチル化されたフェニルアラニンの質量スペクトルを示す。そして図22に、得られたアセチル化されたフェニルアラニンのオキ

サゾロン誘導体の分子イオンを示す。

【実施例 8】ここでは、アセチル化されたアミノ酸由来のオキサゾロン誘導体にアルコールの蒸気を作用させて、アセチル化されたアミノ酸のエステルとする工程を示す。前述の実施例にしたがって得られたアセチル化されたフェニルアラニンのオキサゾロン誘導体に、1、1、1、3、3、3-ヘキサフルオロ-2-プロピルアルコールの蒸気を50℃において10分間作用させた。

【0035】図23は、ここで得られた化合物の質量スペクトルである。明瞭なアセチル化されたフェニルアラニンの1、1、1、3、3、3-ヘキサフルオロ-2-プロピルエステルの質量に相当する分子イオンが検出されている。このことから、アセチル化されたアミノ酸のエステルが得られることがわかる。

【0036】（実施例 9）ここでは、アセチル化されたアミノ酸由来のオキサゾロン誘導体にアミンの蒸気を作用させて、アセチル化されたアミノ酸のアミドとする工程を示す。前述の実施例にしたがって得られたアセチル化されたフェニルアラニンのオキサゾロン誘導体に、1、1、1-トリフルオロ-2-アミノエタンの蒸気を50℃において10分間作用させた。図24は、ここで得られた化合物の質量スペクトルである。アセチル化されたフェニルアラニンの1、1、1-トリフルオロエチルアミドの質量に相当する分子イオンが検出されている。このことから、アセチル化されたアミノ酸のアミドが得られることがわかる。

【0037】以上述べてきた結果をまとめると次のようになる。第1段階として、C末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドに、一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  (nは1あるいは2) で表される有機酸の蒸気を作用させて、C末端のアミノ酸を遊離させた後、第2段階として、そのアミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物に無水酢酸の蒸気を作用させて、そのアミノ酸をアセチル化し、アセチル化されたアミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とし、第3段階として、この混合物にさらに無水酢酸の蒸気を作用させて、アセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体と新たに生成されたC末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とし、この混合物からアセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体を有機溶媒で抽出して同定する、という一連の操作を繰り返すことにより、試料としたタンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定することができる。

【0038】上記の、C末端がオキサゾロン誘導体であるタンパク質あるいはペプチドは、タンパク質あるいはペプチドに無水酢酸の蒸気を作用させてアセチル化され

たタンパク質あるいはペプチドとした後に、さらに無水酢酸の蒸気を作用させて得たものである。

【0039】

【発明の効果】本発明の重要な点は、第1段階として、C末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドに、一般式、

$\text{CF}_3 - (\text{CF}_2)_n - \text{COOH}$  (nは1あるいは2) で表される有機酸の蒸気を作用させて、C末端のアミノ酸を遊離させた後、第2段階として、そのアミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物に無水酢酸の蒸気を作用させて、そのアミノ酸をアセチル化し、アセチル化されたアミノ酸とC末端のアミノ酸を失ったアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とし、第3段階として、この混合物にさらに無水酢酸の蒸気を作用させて、アセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体と新たに生成されたC末端がオキサゾロン誘導体であるアセチル化されたタンパク質あるいはペプチドとの混合物とし、この混合物からアセチル化されたC末端アミノ酸由来のオキサゾロン誘導体を有機溶媒で抽出して同定する、という一連の操作を繰り返すことによって、酵素を用いることなくタンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を順次決定することが可能になったことである。

【0040】よって、本発明によるタンパク質あるいはペプチドのC末端からのアミノ酸配列を決定する方法はその工業的価値が大である。

（配列表）

配列番号：1

30 配列の長さ：2

配列の形：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Val-Phe

1

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の分析方法を示す工程図である。

40 【図2】カルボキシペプチダーゼを用いた場合の従来の分析方法を示す工程図である。

【図3】トリメチルシリルイソチオシアナートを用いた場合の従来の分析方法である。

【図4】本発明の分析方法における操作を示す図である。

【図5】Val-Pheの質量スペクトルを示したものである。

【図6】Val-Pheに30%の無水酢酸と1%のピリジンを含む酢酸溶液を用いて無水酢酸の蒸気を30℃において10分間作用させて得られた生成物の質量スペクトルである。



【図7】アセチル化されたVal-Phe に無水のアセトニトリルを溶媒とした0.1%のピリジンを含む30%の無水酢酸を用いて30℃において10分間無水酢酸の蒸気作用させて得られた生成物の質量スペクトルである。

【図8】アセチル化されたVal-Phe のオキサゾロン誘導体に、90℃で10分間加熱して、100%のPFPAから作られた蒸気作用させて得られた生成物の質量スペクトルである。

【図9】アセチル化されたVal-Phe のオキサゾロン誘導体に、90℃で10分間加熱して、90%のPFPAから作られた蒸気作用させて得られた生成物の質量スペクトルである。

【図10】アセチル化されたVal-Phe のオキサゾロン誘導体に、90℃で10分間加熱して、80%のPFPAから作られた蒸気作用させて得られた生成物の質量スペクトルである。

【図11】アセチル化されたVal-Phe のオキサゾロン誘導体に、90℃で10分間加熱して、70%のPFPAから作られた蒸気作用させて得られた生成物の質量スペクトルである。

【図12】アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気作用させる温度を90℃とした場合の結果を示したものである。

【図13】アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気作用させる温度を80℃とした場合の結果を示したものである。

【図14】アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気作用させる温度を70℃とした場合の結果を示したものである。

【図15】アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気作用させる温度を60℃とした場合の結果を示したものである。

【図16】アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気作用させる時間を10分間とした場合の結果を示したものである。

【図17】アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気作用させる時間を5分間とした場合の結果を示したものである。

【図18】アセチル化されたタンパク質あるいはペプチドのオキサゾロン誘導体に、PFPAの蒸気作用させる時間を2分間とした場合の結果を示したものである。

【図19】アセチル化されたVal-Phe に無水のアセトニトリルを溶媒とした30%の無水酢酸を用いて30℃において10分間無水酢酸の蒸気作用させて得られた生成物の質量スペクトルである。

【図20】アセチル化されたVal-Phe に無水のアセトニトリルを溶媒とした1%のピリジンを含む30%の無水酢酸を用いて30℃において10分間無水酢酸の蒸気作用させて得られた生成物の質量スペクトルである。

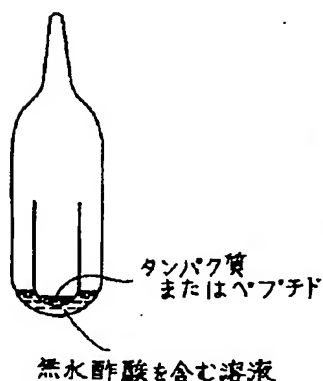
【図21】アセチル化されたフェニルアラニンの質量スペクトルである。

【図22】アセチル化されたフェニルアラニンのオキサゾロン誘導体の質量スペクトルである。

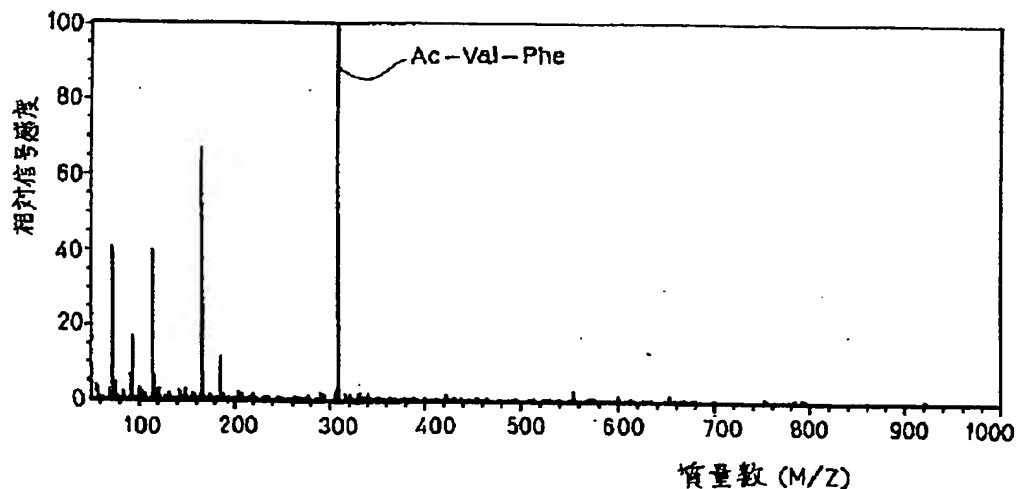
【図23】アセチル化されたフェニルアラニンのオキサゾロン誘導体に、1, 1, 1, 3, 3, 3-ヘキサフルオロ-2-プロピルアルコールの蒸気を50℃において10分間作用させて得られた化合物の質量スペクトルである。

【図24】アセチル化されたフェニルアラニンのオキサゾロン誘導体に、1, 1, 1-トリフルオロ-2-アミノエタンの蒸気を50℃において10分間作用させて得られた化合物の質量スペクトルである。

【図4】



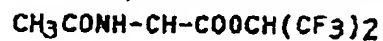
【図5】



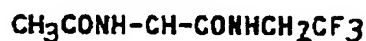


$$\begin{array}{ccccccc} \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{CO} & \cdots & \text{HN}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ | & & | & & | & & | \\ \text{R}_1 & & \text{R}_{n-2} & & \text{R}_{n-1} & & \text{R}_n \end{array}$$
$$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3\text{CONH}-\text{CH}-\text{CO} & \cdots & \text{NH}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ | & & | & & | & & | \\ \text{R}_1 & & \text{R}_{n-2} & & \text{R}_{n-1} & & \text{R}_n \end{array}$$
$$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3\text{CONH}-\text{CH}-\text{CO} & \cdots & \text{NH}-\text{CH}-\text{CONH} & - & \text{CH} & - & \text{C} = \text{N} \\ | & & | & & | & & | & | \\ \text{R}_1 & & \text{R}_{n-2} & & \text{R}_{n-1} & & \text{O} & \text{CHR}_n \\ & & & & & & \diagdown & \diagup \\ & & & & & & \text{CO} & \end{array}$$
$$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3\text{CONH}-\text{CH}-\text{CO} & \cdots & \text{NH}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}-\text{COOH} & + & \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{COOH} \\ | & & | & & | \\ \text{R}_1 & & \text{R}_{n-2} & & \text{R}_{n-1} & & \text{R}_n \end{array}$$
$$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3\text{CONH}-\text{CH}-\text{CO} & \cdots & \text{NH}-\text{CH}-\text{CONH}-\text{CH}-\text{COOH} & + & \text{CH}_3\text{CONH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ | & & | & & | & & | \\ \text{R}_1 & & \text{R}_{n-2} & & \text{R}_{n-1} & & \text{R}_n \end{array}$$
$$\begin{array}{ccccccc} \text{CH}_3\text{CONH}-\text{CH}-\text{CO} & \cdots \cdots & \text{NH}-\text{CH} & - & \text{C} = \text{N} & + & \text{CH}_3-\text{C} = \text{N} \\ | & & | & & | & & | \\ \text{R}_1 & & \text{R}_{h-2} & & \text{O} & & \text{O} \\ & & & & \text{CHR}_{h-1} & & \text{CHR}_h \\ & & & & \diagdown \quad \diagup & & \diagdown \quad \diagup \\ & & & & \text{CO} & & \text{CO} \end{array}$$

↓ HFPあるいはHFEA

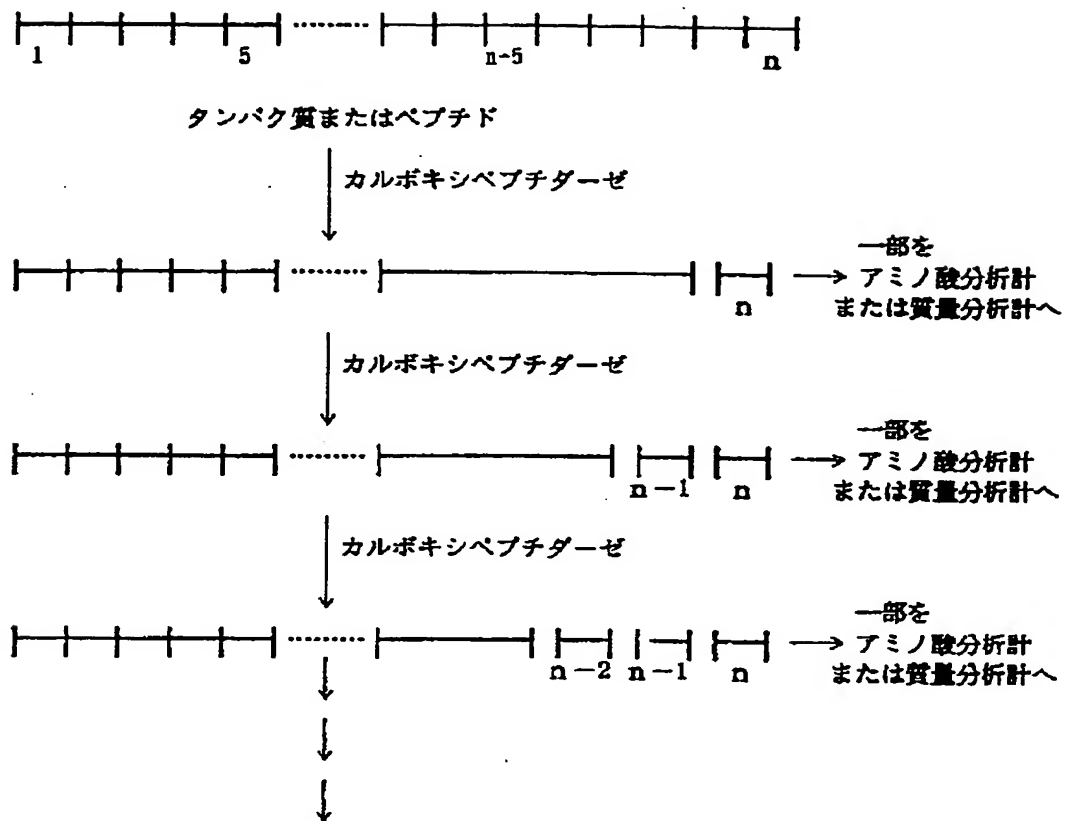


あるいは

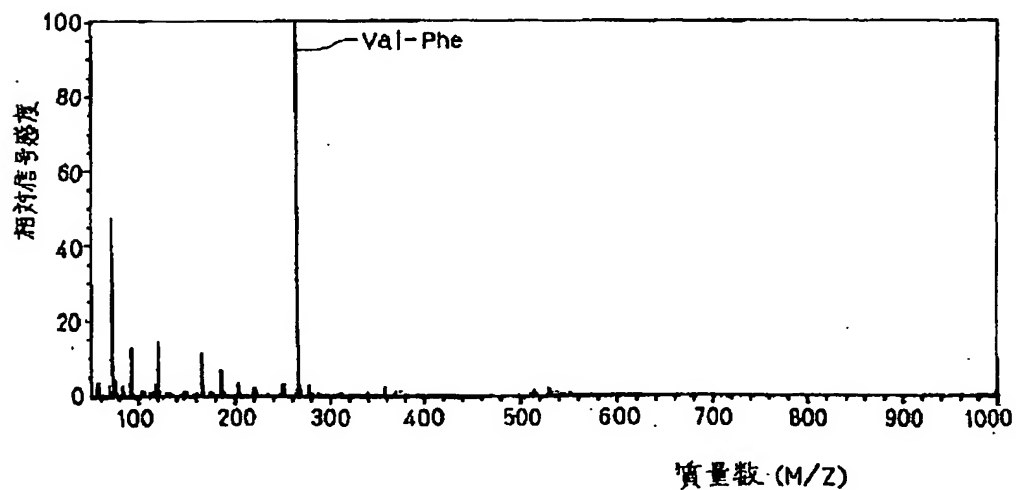


Rn

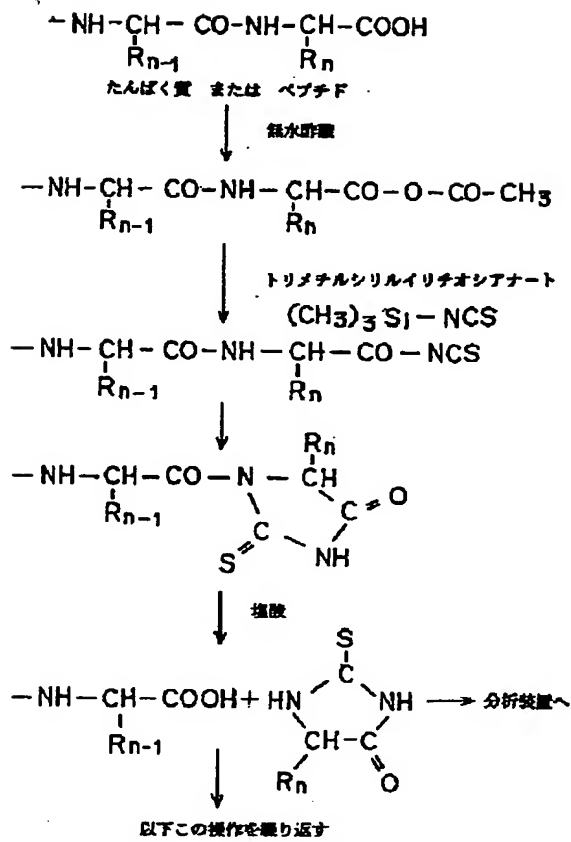
【図 2】



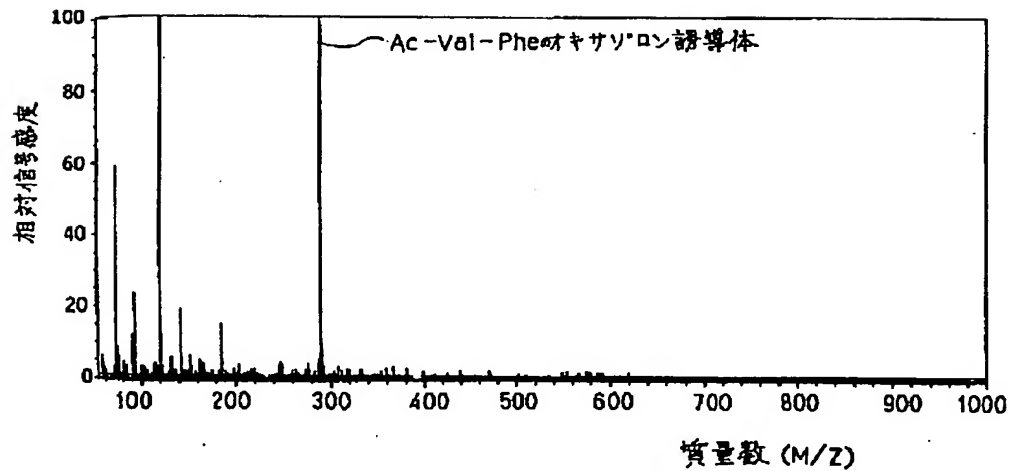
【図 6】



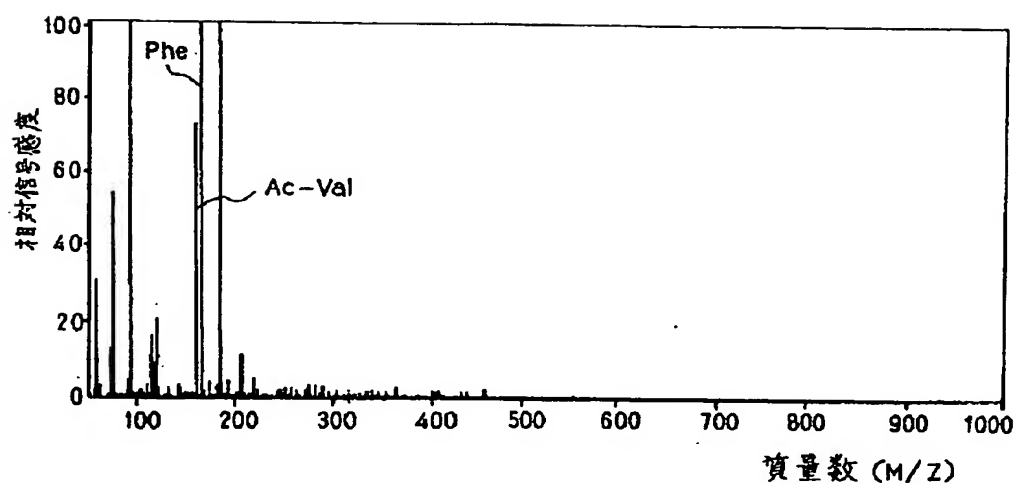
【図 3】



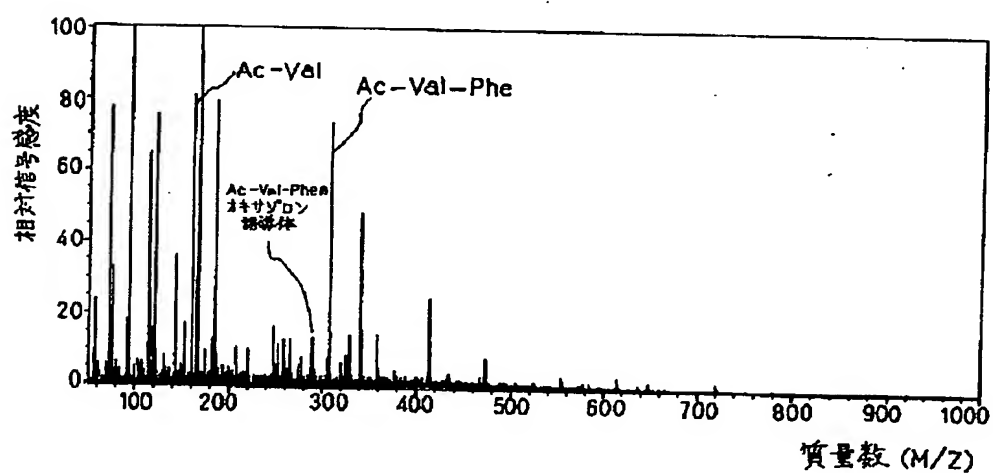
【図 7】



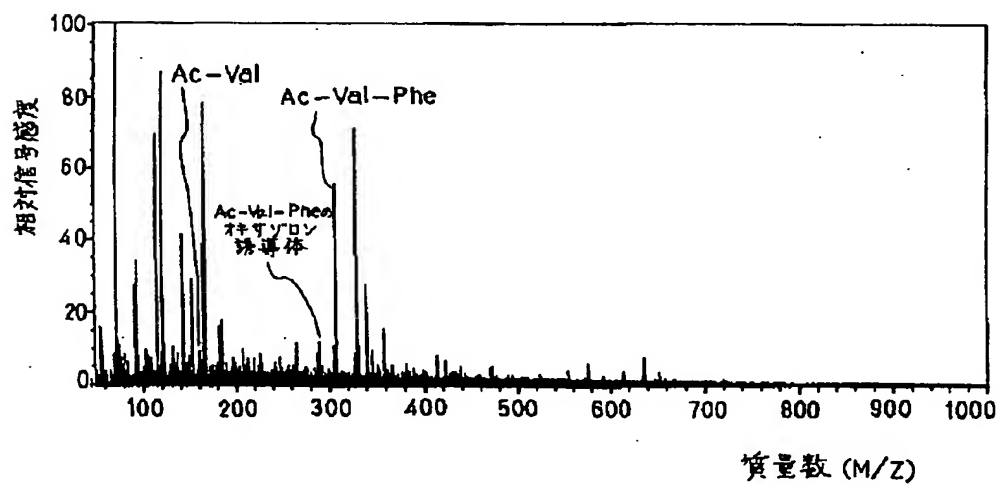
【 図 8 】



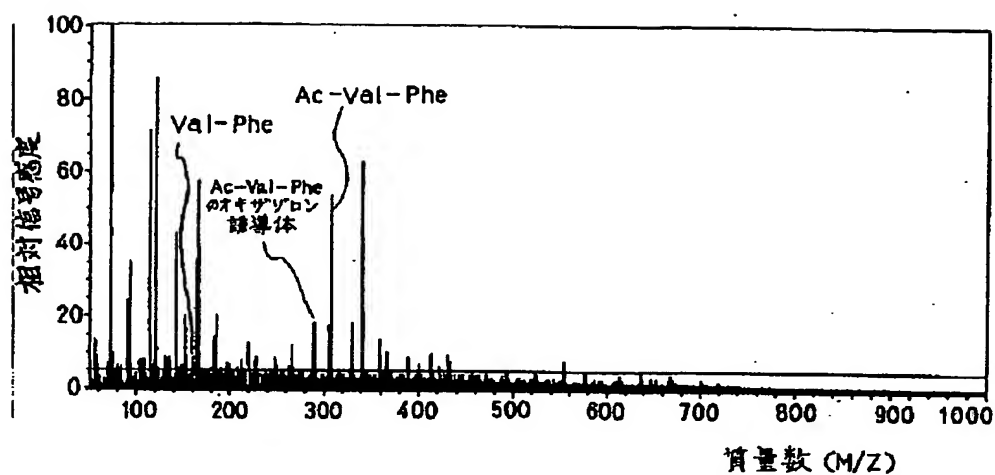
【 図 9 】



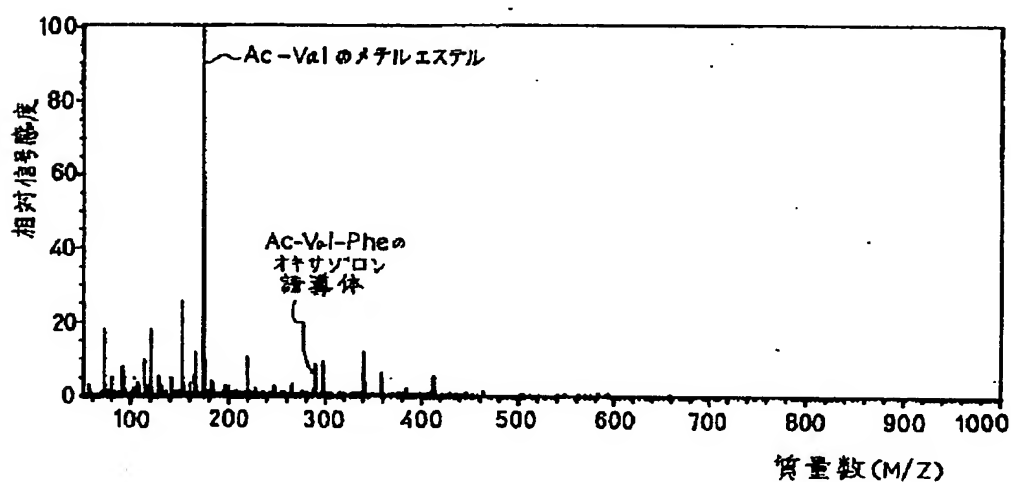
【 図 10 】



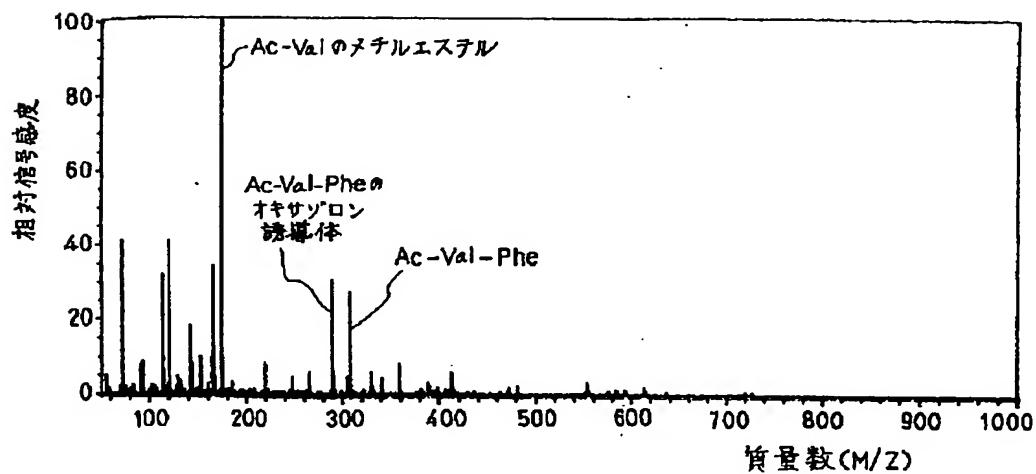
【図 1 1】



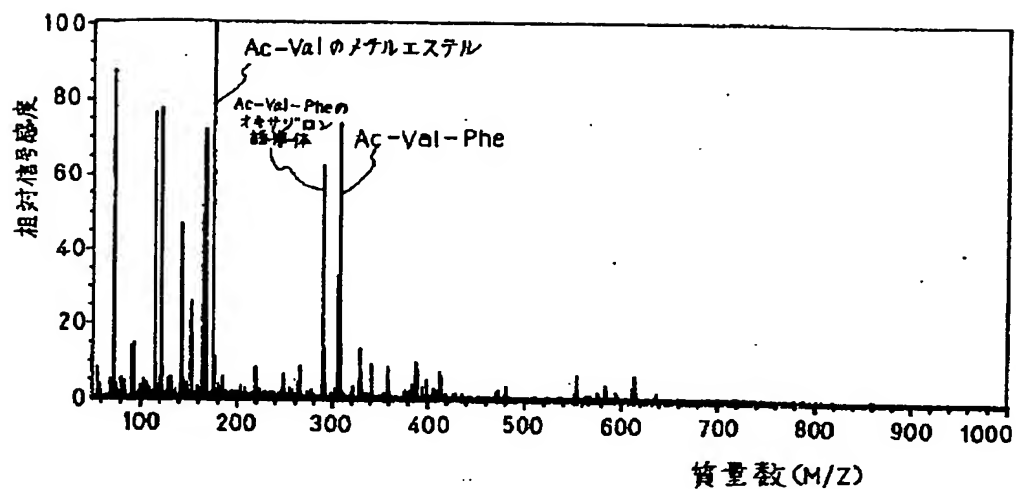
【図 1 2】



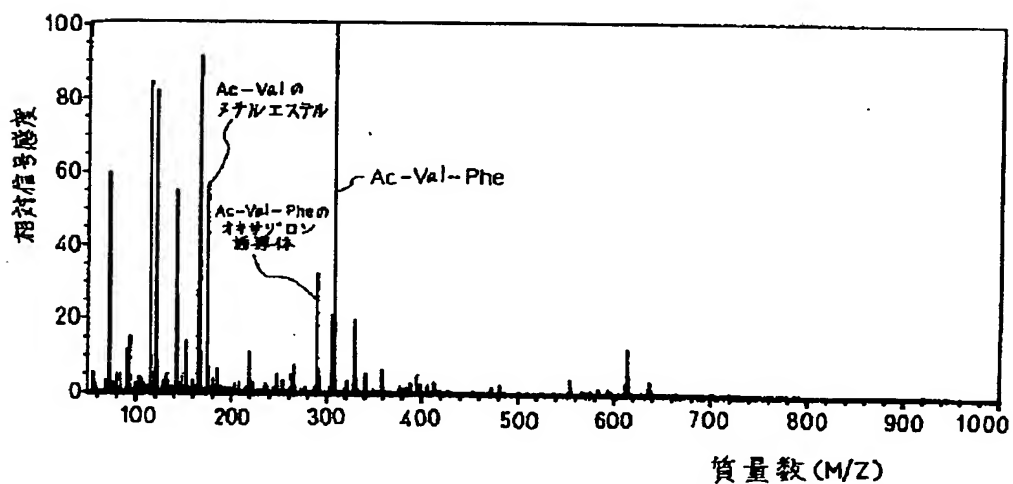
【図 1 3】



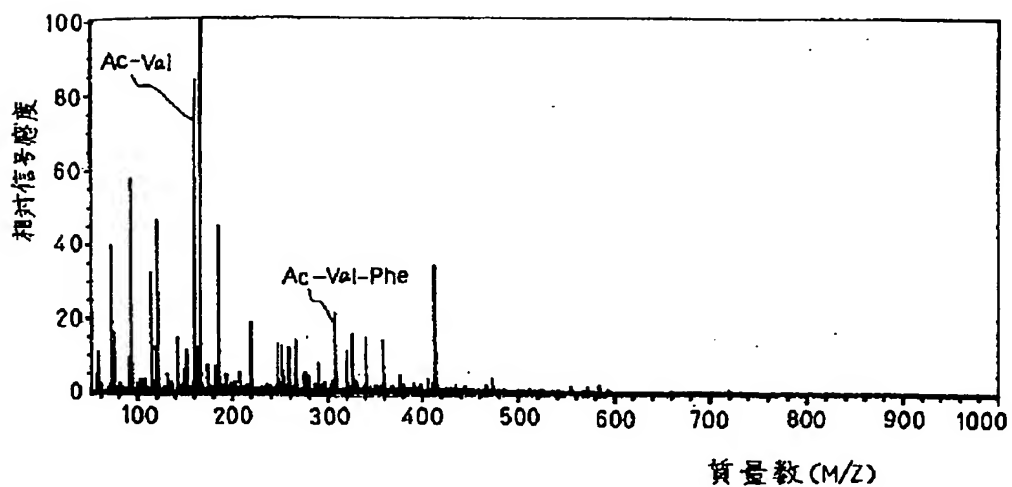
【図 1 4】



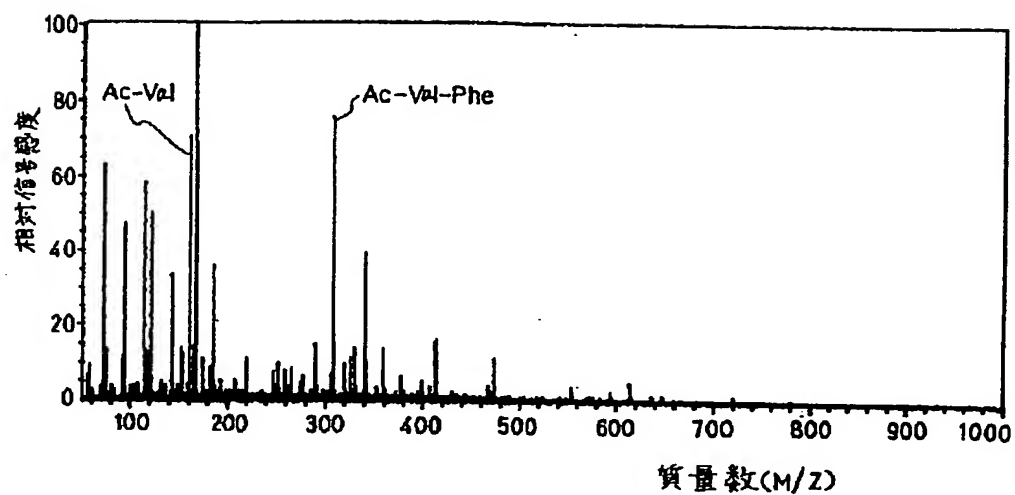
【図 1 5】



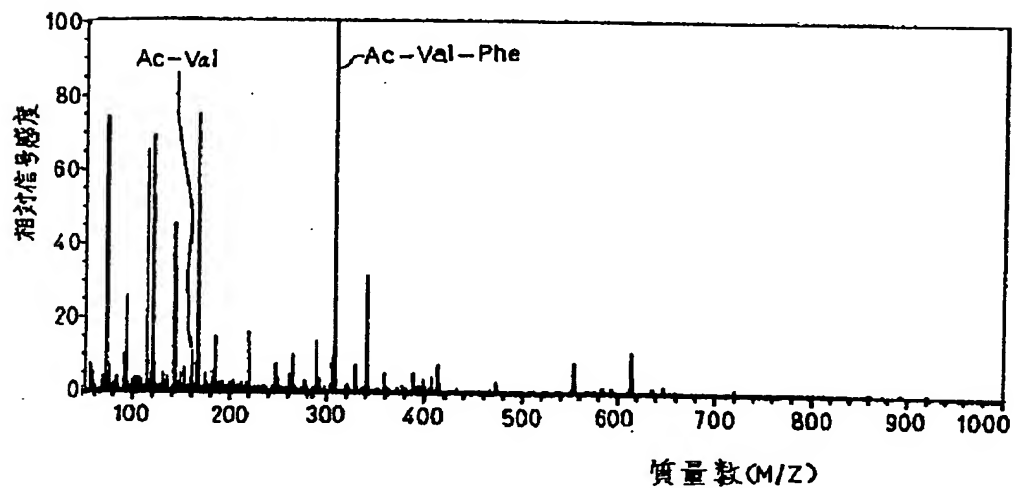
【図 1 6】



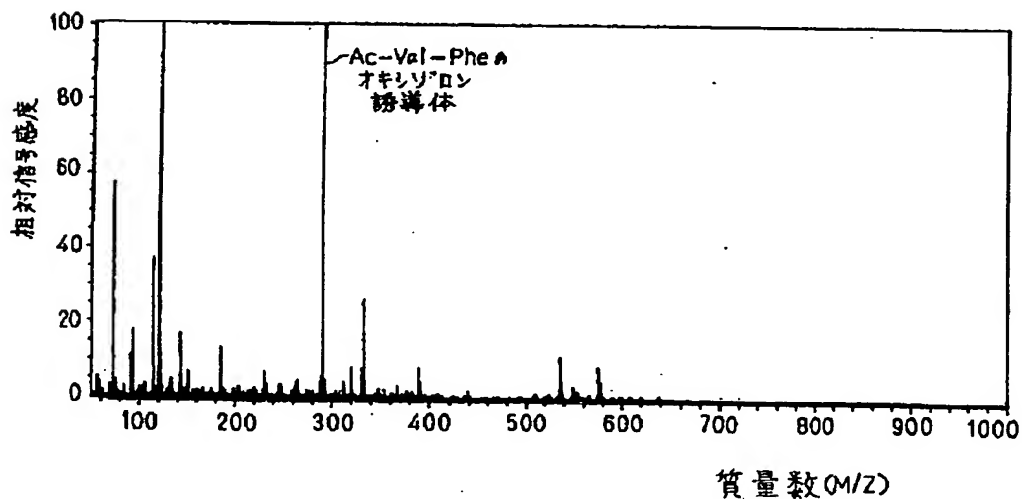
【図 1 7】



【図 1 8】

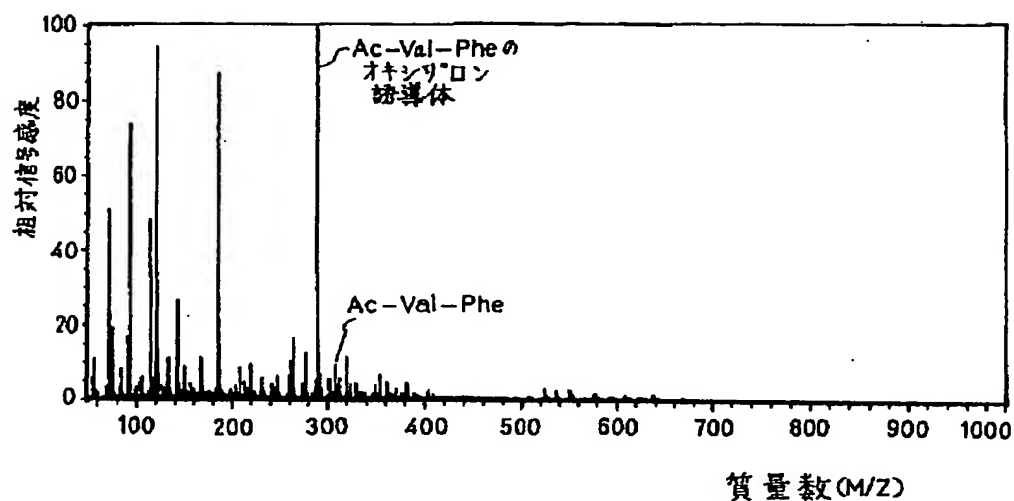


【図 2 0】

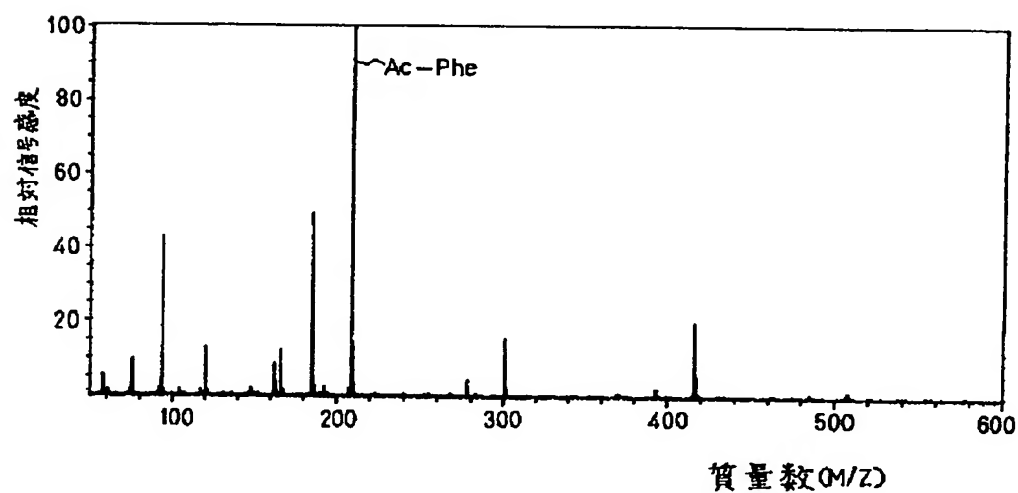




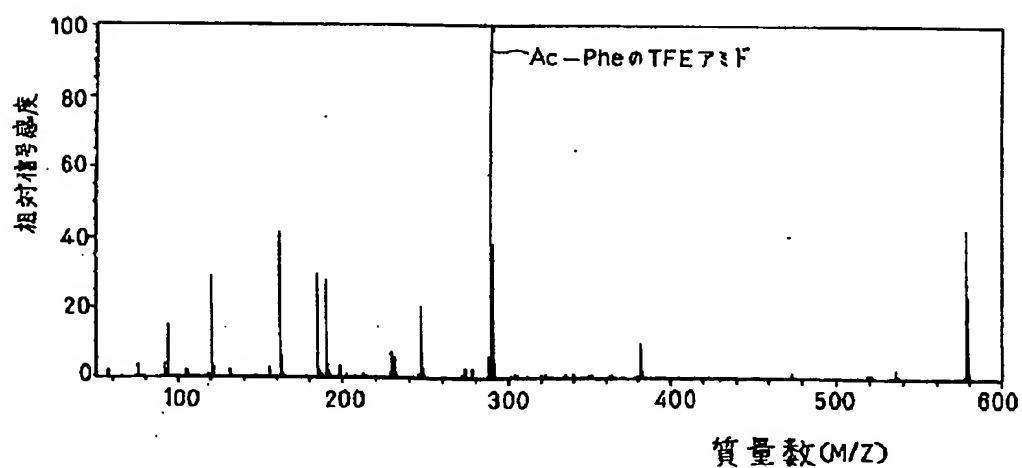
【図 1 9】



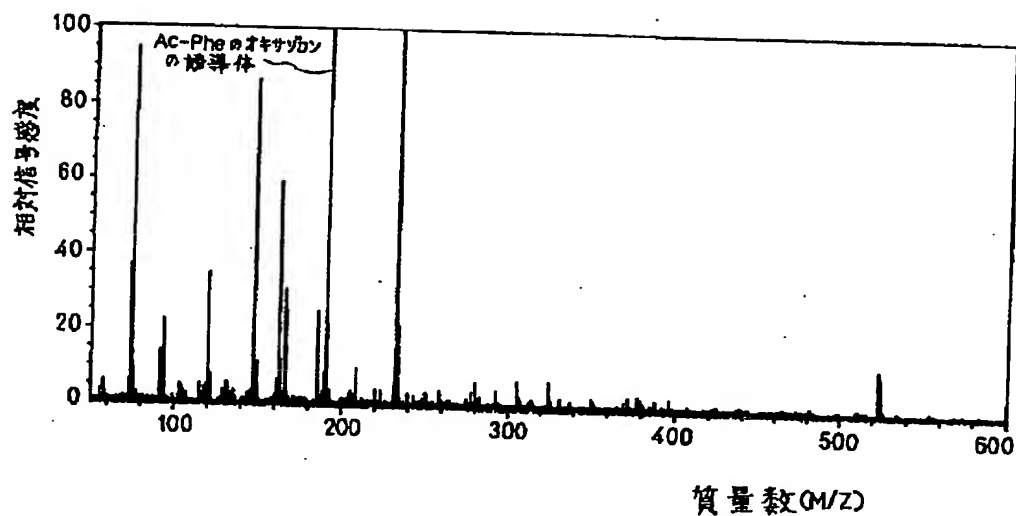
【図 2 1】



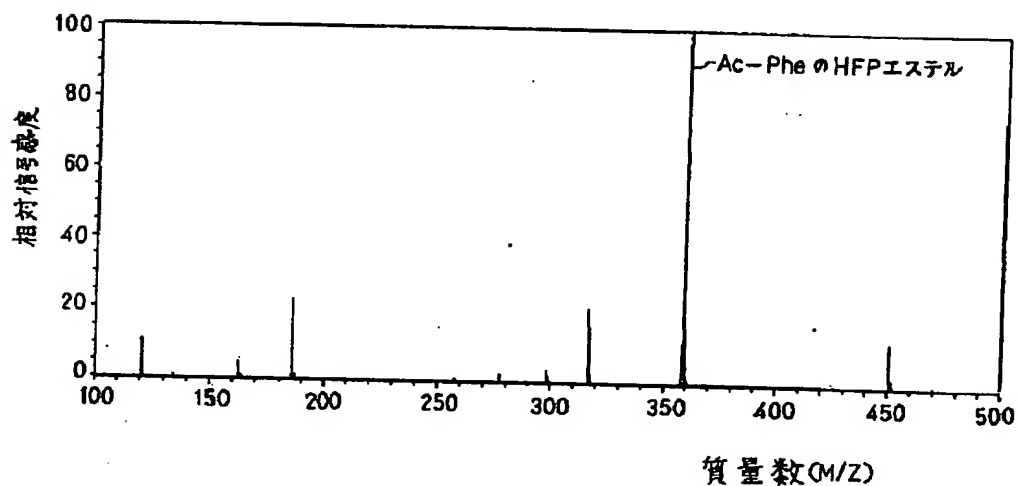
【図 2 4】



【図22】



【図23】



フロントページの続き

- (72)発明者 岩館 寛大  
千葉県野田市下三ヶ尾435-1-103
- (72)発明者 内田 豊明  
東京都江東区亀戸6丁目31番1号 セイ  
コー電子工業株式会社内
- (72)発明者 佐野 満  
大阪府寝屋川市下木田町14番5号 倉敷  
紡績株式会社技術研究所内